

Bilirubin の分解に関する分光化学的研究

第 1 編

苛性曹達水溶液中結晶 Bilirubin の酸素酸化に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)
(指導: 九州大学 山岡教授)

竹 内 亮

〔昭和 34 年 9 月 8 日受稿〕

Bilirubin が Alkali 溶液中で破壊される事は, Heilmeyer & Krebs¹⁾, A. Thiel u. O. Petter²⁾, 江国³⁾ らが安那加を Alkali 剤として使用した報告があり, 苛性曹達水溶液中での酸化については R. Lemberg⁴⁾, G. Barac⁵⁾ は結晶 Bilirubin を苛性曹達水溶液に溶解し酸素酸化を行うと, Biliverdin となる事を認め, 教室木村⁶⁾ は Bilirubin Natrium 塩の性状を検討中, 同じく Biliverdin を経て Diazo 反応陰性の黄色物質になる事を報告した。

著者はこの過程を細検するため, 先づ Kodak 会社製結晶 Bilirubin 1.0 mg を N/10 苛性曹達 5.0 cc に溶かした後, 1.0 cc 宛 4 本の試験管に分注し, 之に各種 pH の N/10 磷酸塩緩衝液 9.0 cc を加え, 夫々 pH 9.2, 8.2, 7.2, 6.2 とし, 各試験管の経時的観察を行つた (Fig. 1~4). 溶解直後は pH 9.2 では黄色で光電分光光度計の可視部吸光曲線の極大は 428 m μ にあり, Diazo 反応迅速紫紅, pH 8.2 は黄色で 435 m μ に吸収極大を有し, Diazo 反応迅速紫紅, pH 7.2 は黄色で 447 m μ に吸収極大を有し Diazo 反応二相性遅延紫紅, pH 6.2 では黄色で 448 m μ に吸収極大があり Diazo 反応は遅延紅色であつた。Gmelin 反応はすべて陽性である。1 時間後は pH 9.2 で黄色, 650 m μ 附近の膨隆と 412 m μ の吸収極大, Diazo 反応二相性迅速紅, pH 8.2 で黄色, 650 m μ 附近の膨隆と 430 m μ の吸収極大, Diazo 反応迅速紫紅, pH 7.2 で黄色, 650 m μ 附近の膨隆と 445 m μ の極大, Diazo 二相性遅延紫紅, pH 6.2 で黄色, 650 m μ 附近の膨隆と 448 m μ の極大, Diazo 反応遅延紅となる。3 時間後は pH 9.2 で緑黄, 630, 407 m μ の極大, Diazo 反応遅延紅, pH 8.2 で黄色, 650 m μ 附近の膨隆と 432 m μ の極大, Diazo 反応二相性遅延紅, pH 7.2 で黄色,

650 m μ 附近の膨隆と 432 m μ の極大, Diazo 反応二相性遅延紅, pH 6.2 で黄色, 650, 445 m μ の極大と Diazo 反応遅延紅色であり, Gmelin 反応は

Fig. 1. Hourly absorption curves in a visible range of crystalline bilirubin.

Medium: N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution (pH 9.2)

Condition: Letting standing in a room

(a) 0 hor (b) 1 hor (c) 3 hors
(d) 6 hors (e) 2 days (f) 3 days
(g) 5 days (h) 10 days

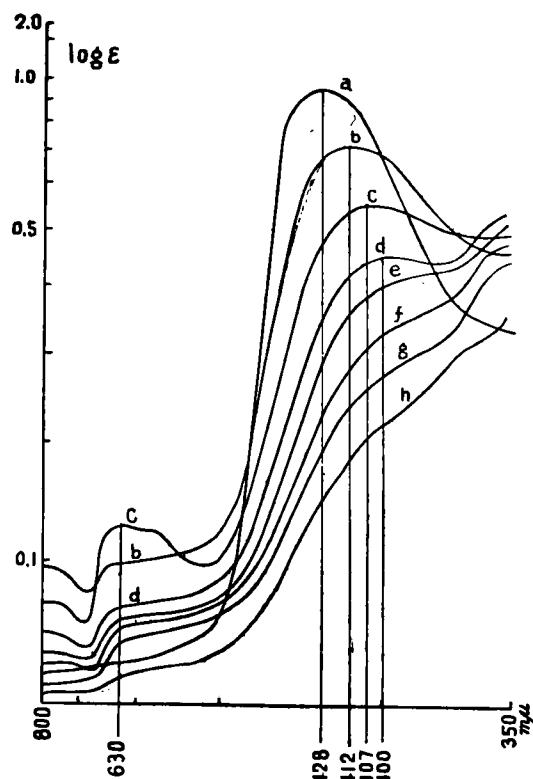
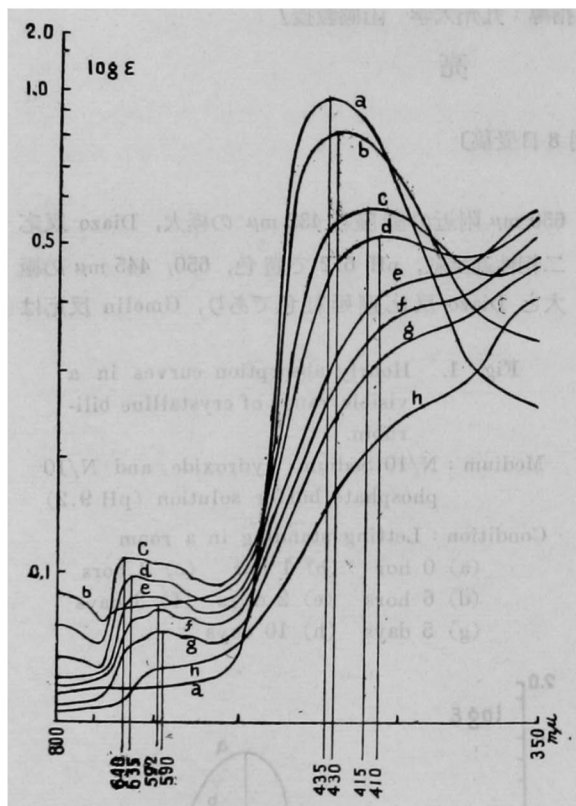


Fig. 2. Hourly absorption curves in a visible range of crystalline bilirubin.

Medium: N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution (pH 8.2)

Condition: Letting Standing in a room

- (a) 0 hor (b) 1 hor (c) 3 hors
(d) 6 hors (e) 2 days (f) 3 days
(g) 5 das (h) 10 dys



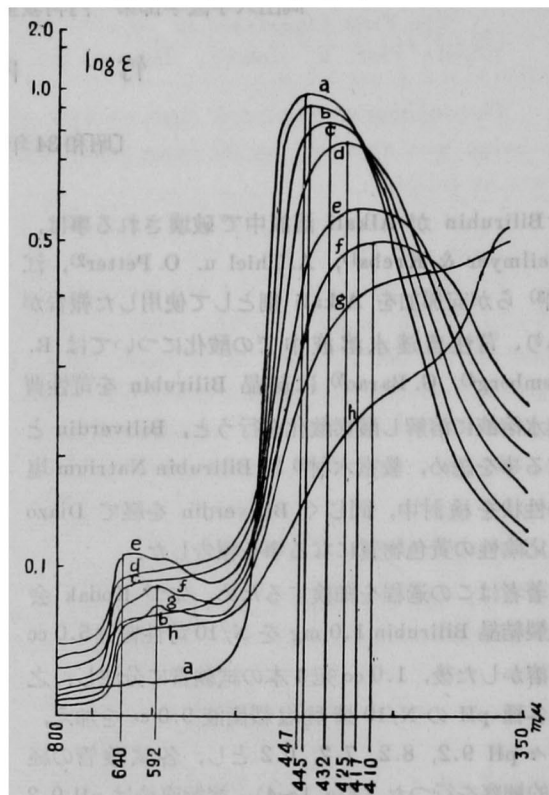
いずれも陽性であつた。6時間後は pH 9.2 で黄緑, 640 mμ 附近の膨隆と 400 mμ の極大, pH 8.2 で黄緑, 635, 410 mμ の極大, pH 7.2 で黄微緑, 650 mμ 附近の膨隆と 425 mμ の極大, pH 6.2 で黄色, 650, 443 mμ に極大があり, いずれも Diazo 反応遅延紅, Gmelin 反応陽性であつた。2日後は pH 9.2 で黄微緑, 640 mμ 附近の膨隆と 500 mμ 附近より紫外部へ向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延淡紅, pH 8.2 で黄緑, 635 mμ の極大と 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延淡紅, pH 7.2 で黄緑で微量の黄色沈澱を認め, 上清を用いると 640, 417 mμ の極大, Diazo 反応遅延紅, pH 6.2 で黄微緑, 微量黄色沈澱があり, 上清は 640, 435 mμ に極大, Diazo 遅延紅色を呈し, いずれも Gmelin 反応陽性, Pentdyopent 反応陰性であつた。なお pH 7.2, 6.2 における微量の黄色沈澱は, 以後経過中引続き認め, 測定にはその上

Fig. 3. Hourly absorption curves in a visible range of crystalline bilirubin.

Medium: N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution (pH 7.2)

Condition: Letting standing in a room

- (a) 0 hor (b) 1 hor (c) 3 hors
(d) 6 hors (e) 2 days (f) 3 days
(g) 5 days (h) 10 days



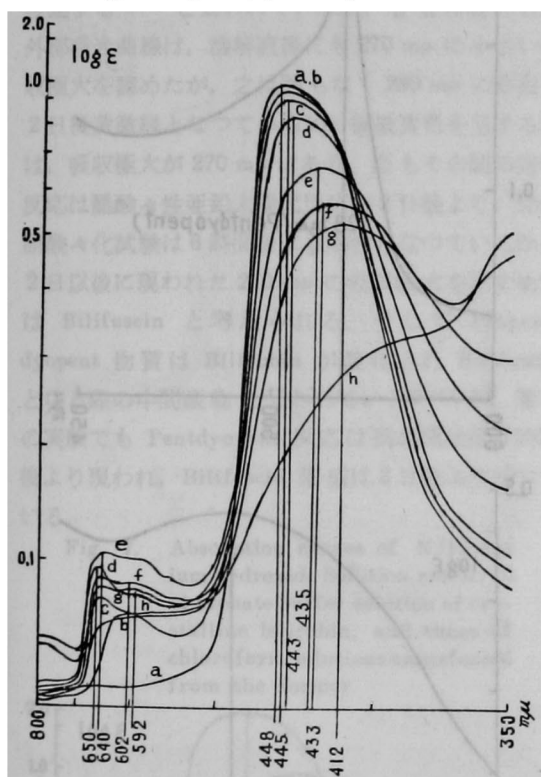
清を用いた。3日後は pH 9.2 で淡黄, 640 mμ 附近の膨隆と 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延橙黄, Gmelin 反応疑陽性, pH 8.2 で黄微緑, 592 mμ の極大と紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延淡紅, Gmelin 反応陽性, pH 7.2 で黄微緑, 592, 400 mμ の極大, Diazo 反応遅延淡紅, Gmelin 反応陽性, pH 6.2 で黄微緑, 640, 602, 435 mμ の極大, Diazo 反応遅延淡紅, Gmelin 反応陽性, Ehrlich 氏 Aldehyd 反応はいずれも陰性であつた。5日後は pH 9.2 で淡黄, 620 mμ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延橙黄, Gmelin 反応陰性, pH 8.2 で淡黄, 590 mμ の極大と紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延橙黄, Gmelin 反応疑陽性, pH 7.2 で黄微緑, 592 mμ の極大と紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応遅延淡紅, Gmelin 反応疑陽性, pH 6.2 で黄微

Fig. 4. Hourly absorptino curves in a visible range of crystalline bilirubin.

Medium N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution

Condition. Letting standing in a room

- (a) 0 hor (b) 1 hor (c) 3 hors
(d) 6 hors (e) 2 days (f) 3 days
(g) 5 days (h) 10 days



緑, 640, 595, 412 $m\mu$ の極大, Diazo 反応遅延淡紅, Gmelin 反応陽性であり, Pentdyopent 反応はいづれも陰性であつた. 10 日後は pH 9.2 で微黄, 吸光曲線は紫外部に向い上昇するのみとなり, pH 8.2 で淡黄, 620 $m\mu$ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線を示し, pH 7.2 で淡黄, 650 $m\mu$ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線を示し, pH 6.2 で淡黄, 635 $m\mu$ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線となり, Diazo 反応はいづれも遅延橙黄, Gmelin 反応陰性, Schlesinger 反応陰性であつた.

以上の如く木村が云うように結晶 Bilirubin は Alkali 溶液に溶解直後は pH が酸性側になるにつれ, その吸収極大は長波長側に移動するが, 時間の経過と共に, 木村, Heilmeyer⁷⁾ の云う如く長波長側の吸光係数は増加し, 短波長側ではその低下を来し, 曲線は平坦化し, 吸収極大は短波長側に移動しつつ消失する. 更に反応 1 時間後より 650 $m\mu$ 附近

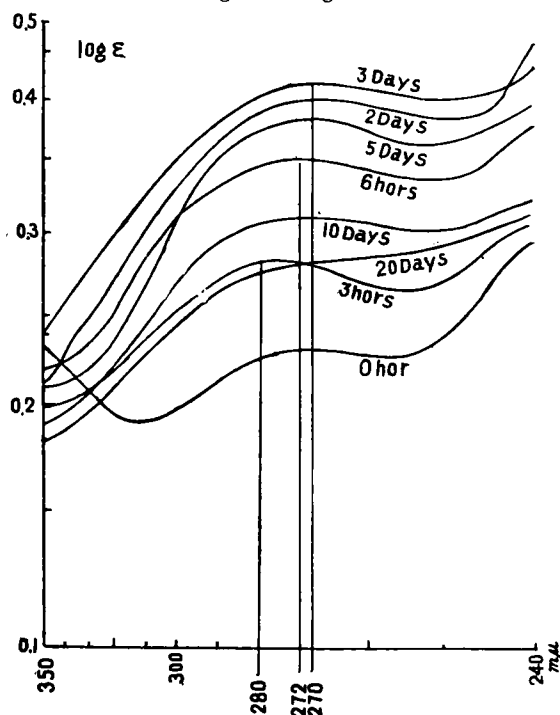
に膨隆が現われ, 時間の経過と共に 650~555 $m\mu$ に汎る吸収帯と, その中に複雑な小さな吸収極大を示し, これは更に経過を追うことにより消失する. その速度は Alkali 度の高い程早く起る. Diazo 反応の pH による変化は, pH 7.8 より塩基性側は迅速反応, 6.8 より二相性迅速反応, 6.6 より酸性側は遅延反応を呈すと云う木村の報告と一致した. 又 Bilirubin-Azo 色素発色の程度は, 遅延反応の側としてその発色は反応 1 時間以内に始まつて強度も最高に達し, 24 時間放置後は色調不変か, 寧ろ減退していた. 放置時間の経過による吸光曲線の変化と Diazo 反応との関係は, Bilirubin の吸収極大の消失に遅れて Diazo 反応橙茶色を示し, Gmelin 反応の消失は更に遅れる. この黄色より黄緑色を経て黄色と変る色調の変化と, Diazo-Gmelin 反応の消失経過も吸光曲線の変化に比例し, Bilirubin は pH の高い溶液中に於て酸化速度の早い事がある. 故に以後の研究は酸素酸化速度の一番早い pH 9.2 に於て行つた.

結晶 Bilirubin 0.4 mg を N/10 苛性曹達水溶液に溶かした後, N/10 磷酸塩緩衝液を加え, pH 9.2, 10 cc としたものを経時的にその 1.0 cc 宛取出し, 同一 pH の磷酸塩緩衝液に希釈し, 紫外部吸光曲線の変化を観察した (Fig. 5). 反応直後は黄色で吸光曲線は 270 $m\mu$ に低い吸収極大を示し, 255 $m\mu$ 附近より短波長側に向い上昇する曲線を示した. 醋酸々性亜鉛末を加えても色調の変化なく, 発煙硝酸滴下により紅色となつた. 3 時間後は黄緑, 280 $m\mu$ の極大と 252 $m\mu$ 附近より短波長側に向い上昇する曲線を得, 醋酸々性亜鉛末添加色調不変, 発煙硝酸滴下により橙黄色となつた. 6 時間後には緑黄, 272 $m\mu$ の極大と短波長側に向い上昇する曲線を得, 醋酸々性亜鉛末添加色調不変, 発煙硝酸滴下により無色となる. 2 日後は黄微緑, 270 $m\mu$ の極大を示し, 醋酸々性亜鉛末添加で色調褪色したので, 試験管底に沈んだ亜鉛末を除き上清を別試験管に移し, 24 時間後に観察すると復色していたが, 発煙硝酸滴下により無色となつた液は 24 時間後の観察で復色しなかつた. 3 日, 5 日, 10 日後も色調は夫々淡黄, 淡黄, 微黄となるが, 吸光曲線は形に著変なく, 270 $m\mu$ の吸収極大の高さが 3 日後に最高となり以後漸次低下して行き, 上記定性反応は 2 日後のものと同様であつた. 20 日後は微黄, 270 $m\mu$ の極大は消失して平坦となり, 250 $m\mu$ 附近より短波長側に向い上昇し, 定性反応は 2 日後のそれと同様であつた.

Fig. 5. Hourly absorption curves in a ultraviolet range of crystalline bilirubin

Medium: N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution

Condition: Letting standing in a room



Pentdyopent 物質について見ると、結晶B ilirubin 0.4 mg を N/10 苛性曹達水溶液及び N/10 磷酸塩緩衝液で pH 9.2, 10 cc に溶かし、室温放置 3 日後のものを岩原法⁹⁾により脱色して得た Propentdyopent 物質の吸光曲線を測定すると、260 mμ に吸収極大を示し、之を更に同氏法により発色させた Pentdyopent 物質を測定すると 523 mμ に吸収極大を示した (Fig. 6). Bilirubin よりの Pentdyopent 物質の吸収極大は 529 mμ と云われているが、著者の実験では測定器具の相異のためか 5 回の測定で、いずれも 523 mμ に極大を示した。次いで結晶 Bilirubin 3.2 mg を同様 pH 9.2, 80 cc に溶かし、経時的に 10 cc 宛取出し前同様の Pentdyopent 呈色反応を行い、523 mμ の吸光係数を検した結果 (Tab. 1) Pentdyopent 物質は反応 6 時間後より現われ、3 日後に最高値を示し、以後は減少して行つた。

Bingold⁹⁾ によると Bilirubin を硝酸に溶かした直後は Pentdyopent 物質は証明されぬが、数時間空气中に放置して淡緑色を呈し、吸光曲線で 640 mμ に吸収極大を見る頃に Pentdyopent 物質が出ると記しているが、著者の実験は Alkali 溶液中での放

Fig. 6. Absorption Spectra of Pentdyopent and Propentdyopent Substance

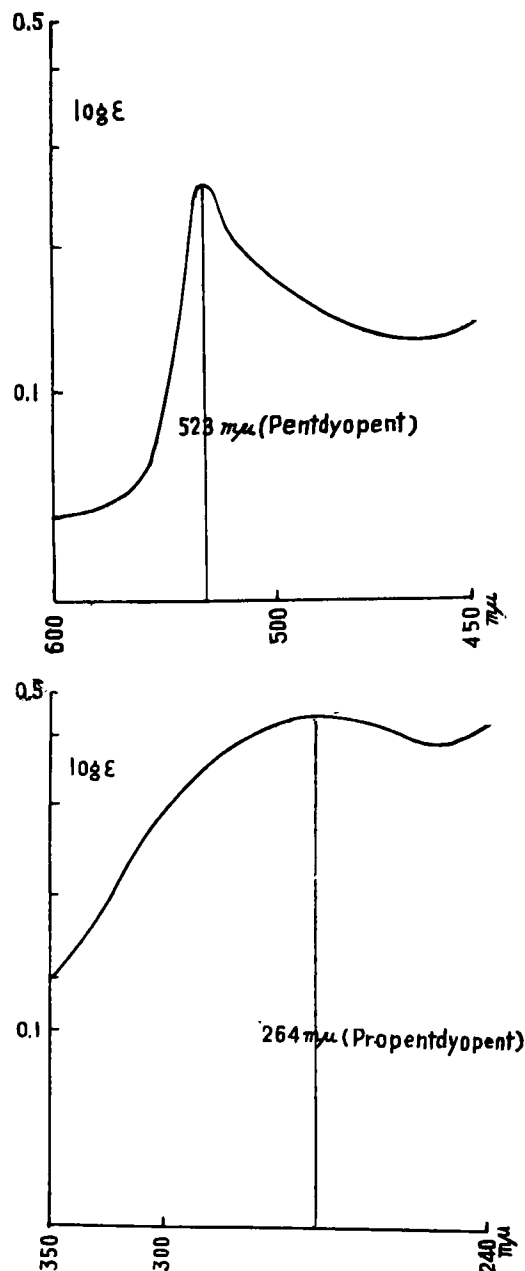


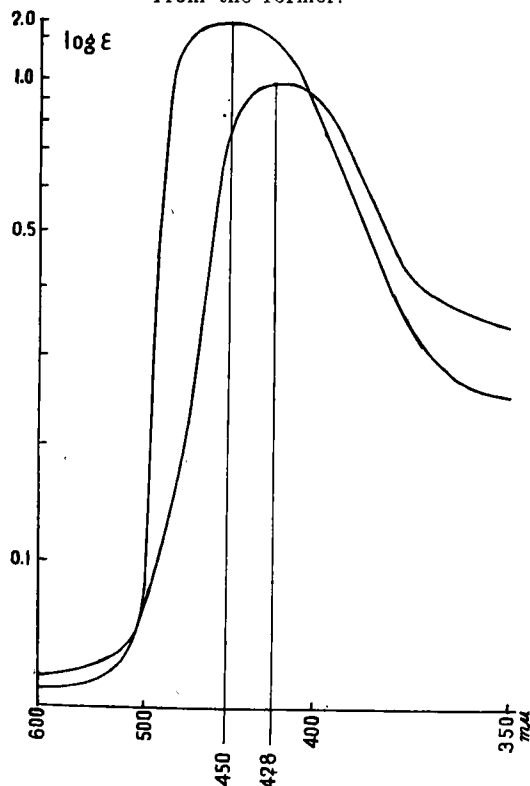
Table 2. Extinctions coefficient of Pentdyopent-Substance. Crystalline Bilirubin is dissolved in N/10 sodium hydroxide solution and mixed with N/10 phosphat buffer solution. H is tested after letting standing in a room temperture for 3 days.

Bilirubin quantity	Pentdyopent-substance 523 mμ
0.2 mg	0
0.4 mg	0.467
0.8 mg	0.898

置ではあるが、Pentdyopent 物質は溶解直後陰性で、6 時間後黄緑色を呈し 640 $m\mu$ 附近に膨隆を認める時始めて陽性となった。

一方 Bilirubin の吸収極大は Alcohol, Dioxan 中で 280 $m\mu$ ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ にあると云われ、又紫外部吸光曲線の吸収極大は同一物質でも溶媒により異つた場所に現われ、水は有機溶媒の場合より短波長側に移動する⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ と云われているが、著者の場合の紫外部吸光曲線は、溶解直後にも 270 $m\mu$ に小さい吸収極大を認めたが、之は間もなく 280 $m\mu$ に移動し、2 日後黄微緑となつてから 10 日後微黄色を呈する間は、吸収極大が 270 $m\mu$ にあり、而もその間の定性反応は醋酸々性亜鉛末還元反応が 2 日後より、発煙硝酸々化試験は 6 時間後より陽性となつているから 2 日以後に現われた 270 $m\mu$ の吸収極大を示す物質は Bilifuscin と考えられる。そして Propentdyopent 物質は Bilirubin が酸化され Bilifuscin となる際の間産物と云われている⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ が、著者の実験でも Pentdyopent 反応は反応開始後 6 時間後より現われ、Bilifuscin 形成は 2 日後より始つて

Fig. 7. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide Solution and N/10 phosphate buffer solution of crystalline bilirubin, and those of chloroform solutions transferred from the former.



以上の実験では反応開始時の Bilirubin 濃度が薄いため、分解過程中出来る物質を詳細に検討する事が困難であつたので、次に Bilirubin を高濃度に溶解して Chromatography を用いて反応進行過程中現われる物質を取出そうと試みた。

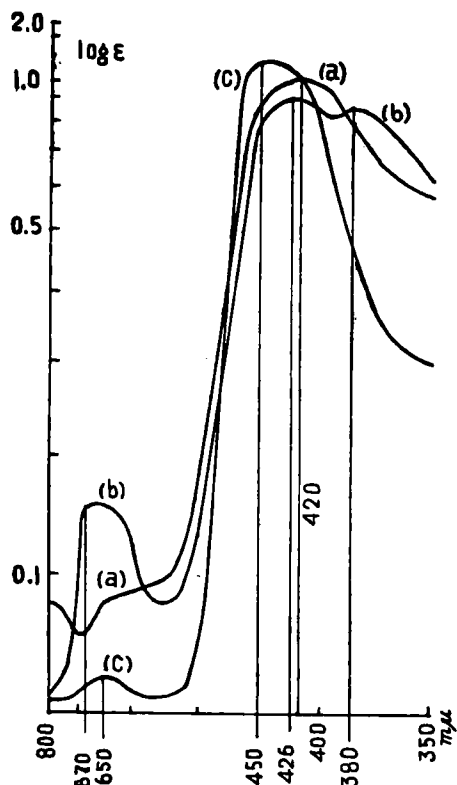
先づ対照として結晶 Bilirubin を上記の方法で溶かし pH 9.2 とし、可視部吸光曲線を描いた後、直ちに 1.25 倍の N/10 塩酸水溶液と Chloroform を加えてよく振盪し、色素を Chloroform に移行させると Chloroform は黄色となり、之と上の緩衝液層との間に微量の緑色層が出来る。この Chloroform 層の吸光曲線を描くと (Fig. 7) の如く、その吸収極大は、前者が 426 $m\mu$ 、後者が 450 $m\mu$ となり、更に Chloroform 層は Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性で、岩田⁽¹⁷⁾, Müller u. Engell⁽¹⁸⁾, Heilmeyer, Lemberg の記載と一致する。

そこで結晶 Bilirubin 約 2.3 mg を上記の方法で溶解し pH 9.2 とし酸素酸化後 Chromatography を行つたもの (Fig. 8 ~ 13) を見ると、反応 3 時間後は、母液は (Fig. 8 A) 黄微緑、吸光曲線は 420 $m\mu$ に吸収極大を有し、Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性である。この際 Chloroform を加え上層部に出来た層を Methanol に溶かした Methanol 層は黄緑で、吸光曲線は 670, 426, 381 $m\mu$ に吸収極大を有し、Diazo 反応疑陽性, Gmelin 反応陽性であり、之を Chromatography で分割すると (Fig. 8 B) 436 $m\mu$ に極大を示し、Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の黄色層 (c), 650, 421 $m\mu$ に極大を示し Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の緑色層 (b) と 650, 378 $m\mu$ に極大があり、Gmelin 反応のみ陽性の緑層 (a) が得られた。母液より Chloroform に抽出した Chloroform 層は黄微緑で 650, 450 $m\mu$ に吸収極大があり、Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性であり、Chromatography を行くと (Fig. 8 C) では黄 (d), 橙 (c), 橙黄 (b) で夫々 450, 445, 440 $m\mu$ に吸収極大があり、いずれも Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の層と、黄微緑で 650, 438 $m\mu$ に吸収極大を有し Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の層が得られた。

所で 650 $m\mu$ に吸収極大を有し、Gmelin 反応のみ陽性の緑色物質は、Lemberg の記載とはやや異なるが、岩田⁽¹⁹⁾, 天田⁽²⁰⁾ の記載した Biliverdin の吸収極大と一致するので、之は Biliverdin であり、450 $m\mu$ に吸収極大を有し、Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の黄色物質は、Fig. 7 の Bilirubin Chloro-

Fig. 8. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in a room for 3 hours and those of separated zones on silicagel

A) Before the Chromatogram



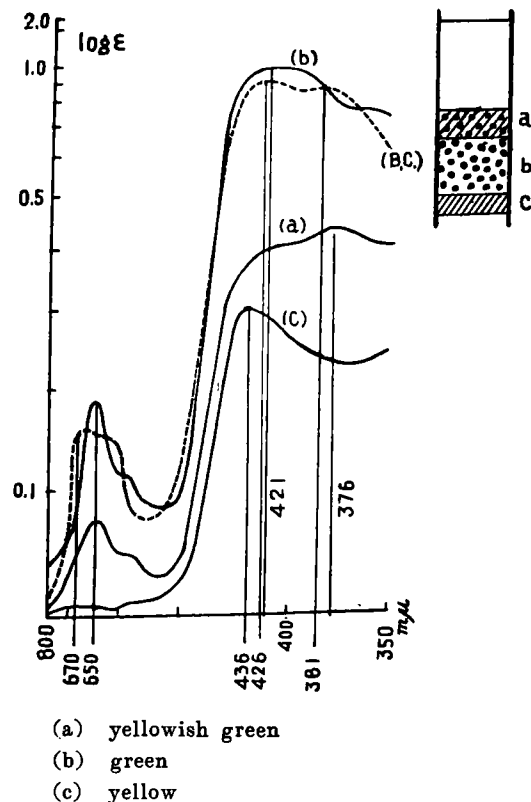
- (a) Mother liquid yellowish slight green
(b) Methanol Phase yellowish green
(c) Chloroform Phase yellowish slight green

form 溶液の吸光曲線と等しいから Bilirubin なることが分る。即ち反応3時間後の Bilirubin Alkali 溶液より得た Chloroform 層から Chromatography を用い分離した (d) 層は、定性反応とその吸光曲線が前記対照曲線と一致するので Bilirubin である。又 (b, c) 層はその定性反応と、日伝²¹⁾が Bilirubin は水溶液として放置すると変色しつつ不安定な物質になると述べたことと考え合わせると、Bilirubin のやや変化したものに Alcohol が加つたため Ester 化の方向に反応進行し、吸収極大の位置がやや短波長へ移動した Bilirubin なることがわかる。(a) 層は Bilirubin の少量を含む Bilirubin である。Methanol 層から分離した (c) 層は Bilirubin, (b) 層は Bilirubin と Biliverdin の混合層, (a) 層は Biliverdin に 376 mμ に極大を有する物質を含んで

B) Methanol Phase

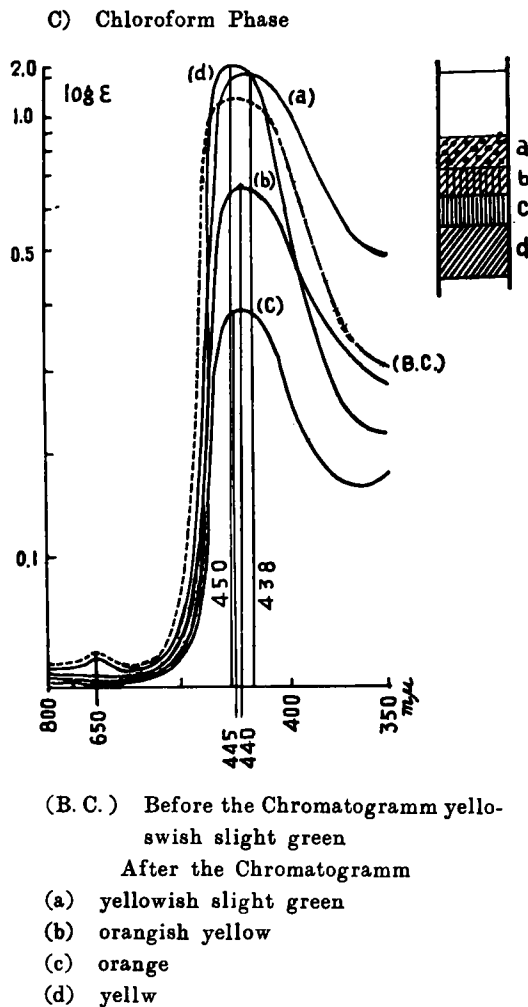
(B. C.) Before the Chromatogram yellowish green

After the Chromatogram



いと解釈される。

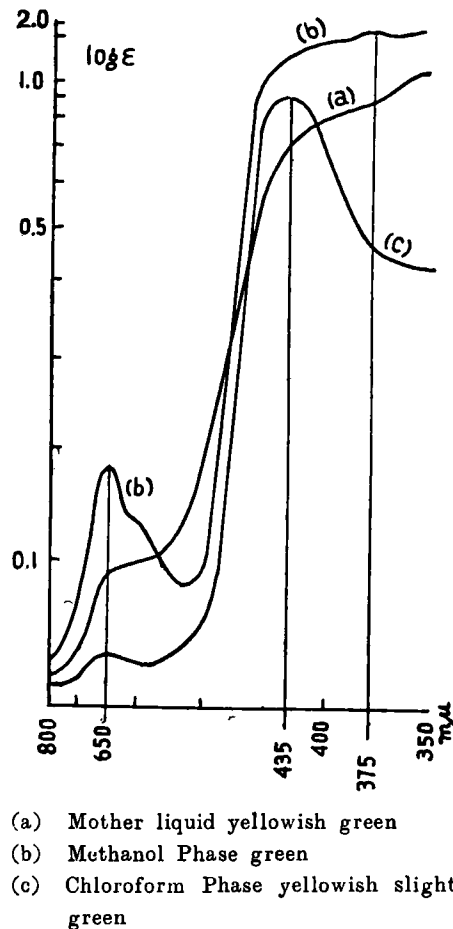
反応3日後は (Fig. 9) 母液は黄緑色を呈し、吸光曲線は 650 mμ 附近の膨隆と 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇し、Diazo 反応陰性、Gmelin 反応のみ陽性である。Methanol 層は緑色で吸光曲線は 650, 375 mμ に極大を示し、Gmelin 反応のみ陽性であり、Chromatography を行うと、黄色の 420 mμ に極大を示し Diazo 反応、Gmelin 反応共陽性の Bilirubin 層 (b) と、緑色で 650 mμ に極大を示し Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin 層に 500 mμ 附近より紫外部に向つて上昇する曲線を含む層 (a) とに分れる。Chloroform 層は黄微緑で 650, 435 mμ に極大を示し Diazo 反応、Gmelin 反応共陽性であり、Chromatography を行うと、黄、黄微緑で夫々 437, 410 mμ に極大を有し、Diazo 反応、Gmelin 反応共陽性の Bilirubin 層 (c, b) と淡黄微緑で 650 mμ の極大と Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に 386 mμ に極大を有する物質を含む層 (a) を得た。



5日後は (Fig. 10) 母液は緑黄, 吸光曲線は3日後のそれと等しく, Diazo 反応陰性, Gmelin 反応疑陽性, Pentdyopent 反応陽性を示した. Methanol 層は緑で吸光曲線は 650, 373 $m\mu$ 極大を有し Gmelin 反応のみ陽性, Chromatography を行くと黄, 緑色で吸光曲線は共に 640 $m\mu$ の極大を示し, Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に 500 $m\mu$ 附近より紫外部に向い上昇する物質を含む層 (b, a) を得たが, Bilirubin, Pentdyopent 物質は証明されなかつた. Chloroform 層は黄緑, 600, 430 $m\mu$ の吸収極大を有し Gmelin 反応のみ陽性である, Chromatography を行くと 434 $m\mu$ に極大を示し Diazo, Gmelin 反応共陽性の Bilirubin 層 (c), 黄緑で 650 $m\mu$ の極大を有し Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に 378 $m\mu$ に極大を有する物質を含む層 (b) 及び淡黄緑で 650 $m\mu$ に極大を示し, Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に 500 $m\mu$ 附近より紫外部に向い上昇する物質を含む層 (a) に分れたが, Pentdyopent

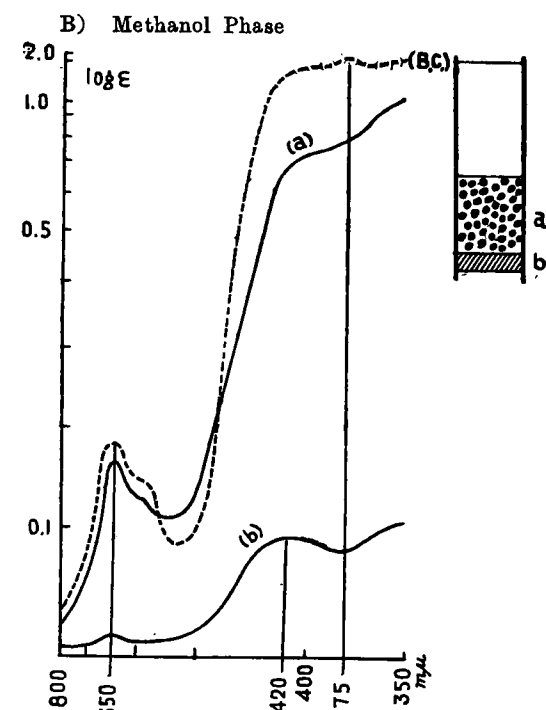
Fig. 9. Absorption curves of N/10 Sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in a room for 3 days and those of separated zones on silica gel

A) Before the Chromatogramm



物質及び 600 $m\mu$ に極大を有する物質は証明出来なかつた.

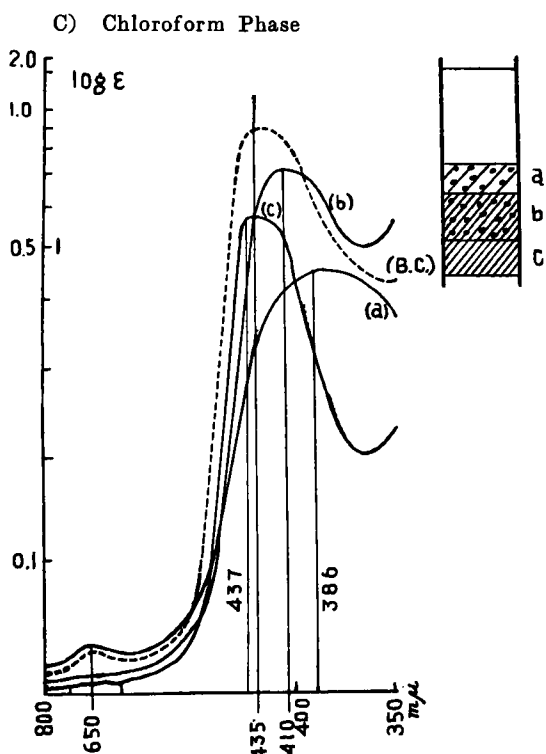
10日後は (Fig. 11) 母液は黄緑, 580 $m\mu$ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線を示し, Gmelin 反応疑陽性, Pentdyopent 反応陽性であつた. この際の Methanol 層は緑色で 650, 605, 366 の吸収極大を示し, Gmelin 反応のみ陽性で, Chromatography を行くと, 緑色で5日後の (a) 層と等しい物質のみを得たが 605, 366 $m\mu$ の吸収極大は消失した. Chloroform 層は黄緑で, 622 $m\mu$ の極大と 500 $m\mu$ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し, Gmelin 反応のみ陽性, Chromatography を行くと, 淡黄で, 500 $m\mu$ 附近より波長短側に向い上昇するのみで紫外部にも吸収極大のない吸光曲線を示し,



(B.C.) Before the Chromatogramm
green

After the Chromatogramm

(a) green
(b) yellow

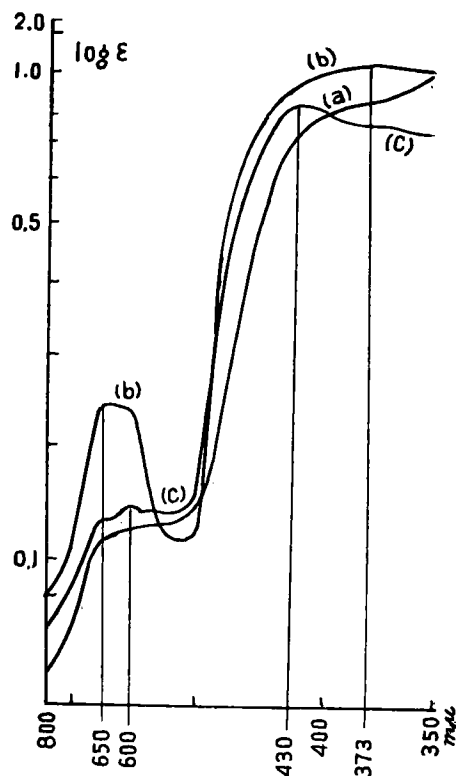


(B.C.) Before the Chromatogramm yellowish slight green

After the Chromatogramm

(a) light yellowish slight green
(b) yellowish slight green
(c) yellow

Fig. 10. Absorption curves of N/10 sodium hydroxyde and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in a room for 5 days and those of separated zones on silicagel



A) Before the Chromatogramm

(a) Mother liquid greenish yellow
(b) Methanol Phase green
(c) Chloroform Phase yellowish green

Diazo 反応陰性, Gmelin 反応疑陽性, 発煙硝酸滴下により瞬时无色となり, 醋酸々性亜鉛末添加で褪色する物質を有する層 (b) と, 645 $m\mu$ の吸収極大と Gmelin 反応疑陽性の Biliverdin に紫外部に向い上昇する曲線を有する物質を含む淡黄緑層 (a) が得られたが, 622 $m\mu$ の極大は証明出来ず, Bilirubin, Pentdyopent 物質はどの分割にも証明出来なかつた。

15日後は (Fig. 12) 母液は黄緑で, 570 $m\mu$ 附近の膨隆と紫外部に向い上昇する曲線を得, Pentdyopent 反応のみ陽性であつた。Meehanol 層は緑色で 605 $m\mu$ の吸収極大あり, Gmelin 反応, Pentdyopent 反応陽性であり, Chromatography を行くと緑黄を示し, 5日後のそれと等しい経過を示す吸収曲線を示し, 定性反応では Gmelin 反応, Pentdyopent 反応陽性で, Biliverdin, Pentdyopent 物質を含んでい

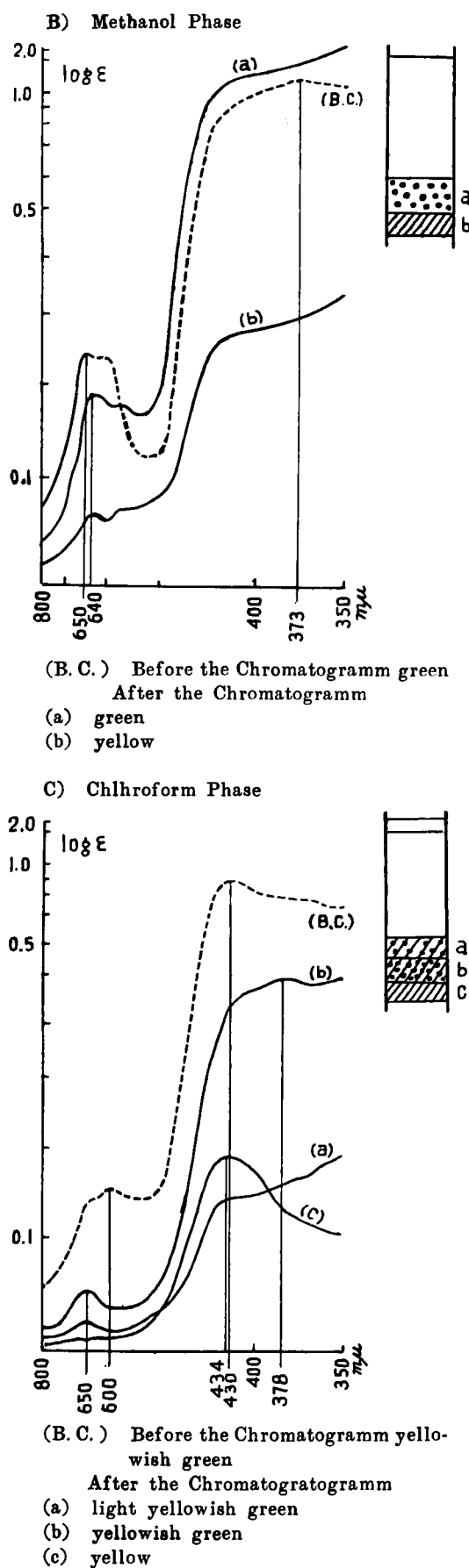
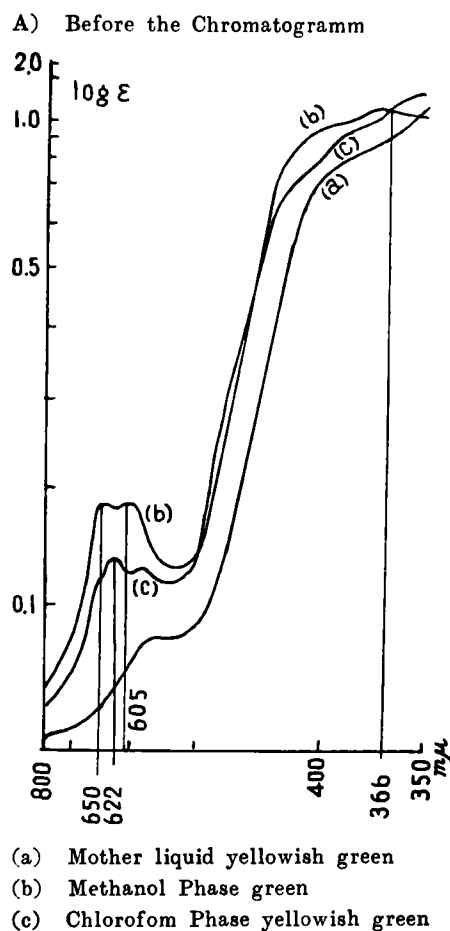


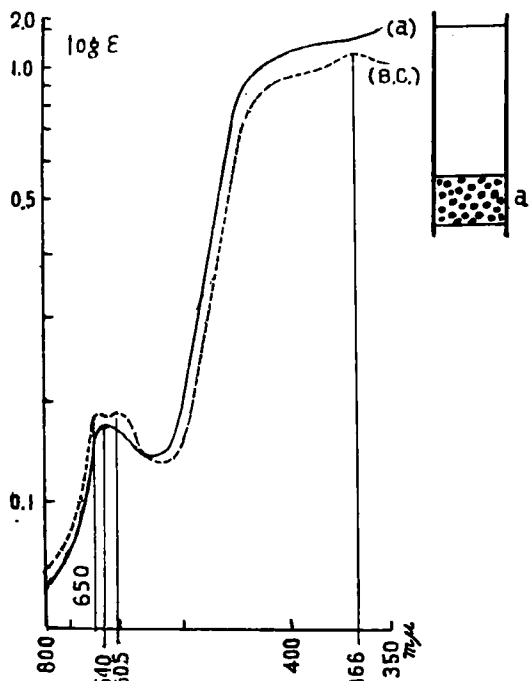
Fig. 11. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in a room for 10 days and those of separated zones of silica gel



る。Chloroform 層は色調、吸光曲線、定性反応共10日後のそれと等しく、Chromatography 後は短波長側に向つて上昇し紫外部にも吸収極大のない曲線を示し、すべて胆汁色素定性反応陰性、発煙硝酸滴下で無色となり、醋酸々性亜鉛未添加で褪色する淡黄色層を得た。然し 622 mμ の極大、Pentdyopent 物質は証明されなかつた。

20日後は (Fig. 13) 母液黄微緑、吸光曲線は紫外部に向い上昇するのみとなり、定性反応では Pentdyopent 反応のみ陽性である。Methanol 層は緑黄で 600 mμ の極大と紫外部に向い上昇する曲線を示し、Pentdyopent 反応のみ陽性で、Chromatography を行うと同じく緑黄であるが 600 mμ の吸収極大は消失し、紫外部に向い上昇する曲線を得、Pentdyopent 反応のみ陽性であつた。Chloroform 層は黄微緑、紫外部に向い上昇する曲線を示し、胆

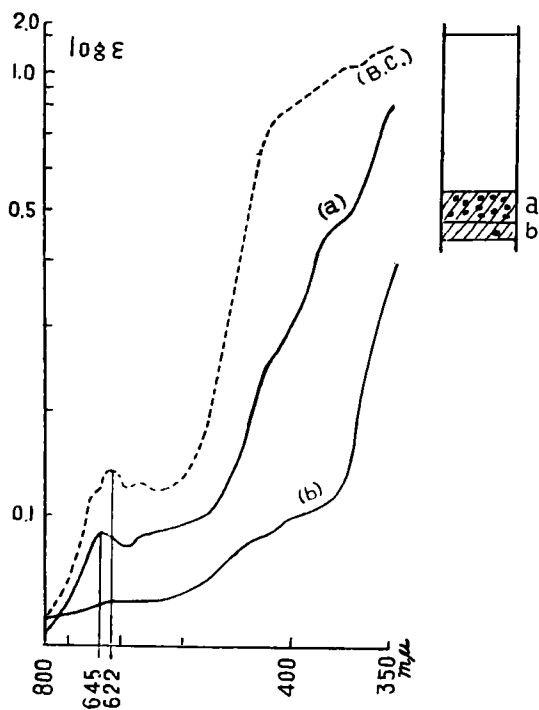
B) Methanol Phase



(B. C.) Before the Chromatogramm green
After the Chromatogramm

(a) green

C) Chloroform Phase



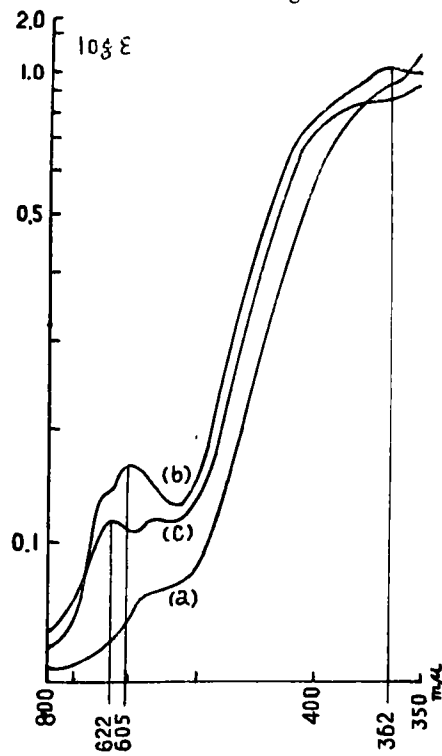
(B. C.) Before the Chromatogramm yellowish green
After the the Chromatogramm

(a) light yellowish green

(b) light yellow

Fig. 12 Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solution after letting standing in a room for 15 days and those of separated zones of silica gel

A) Before the Chromatogramm

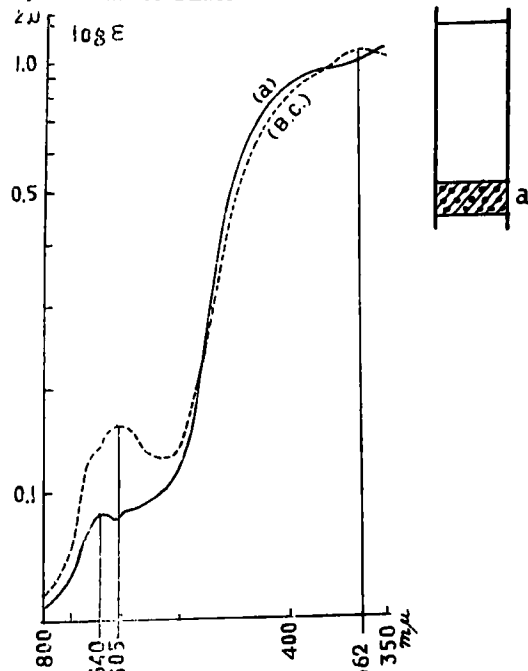


(a) Mother liquid yellowish green

(b) Methanol Phase green

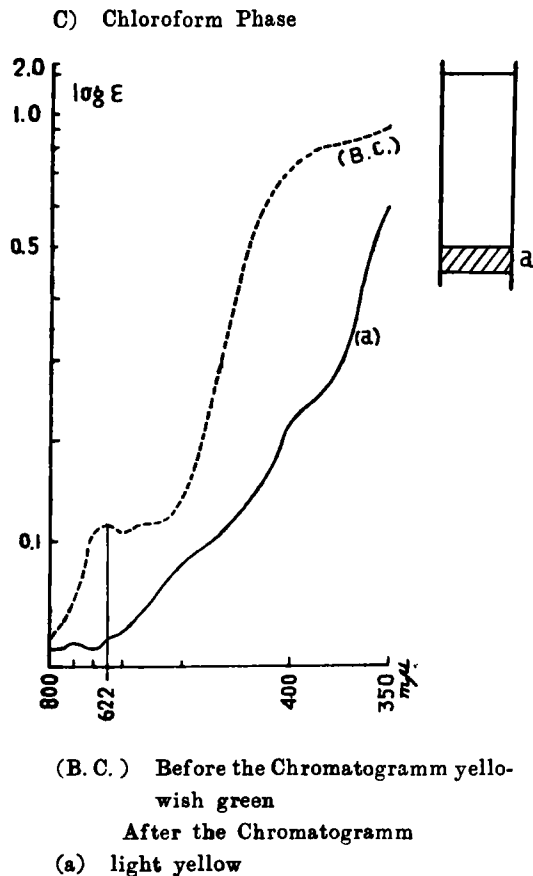
(c) Chloroform phase yellowish green

B) Methanol Phase



(B. C.) Before the Chromatogramm

(a) greenish yellow

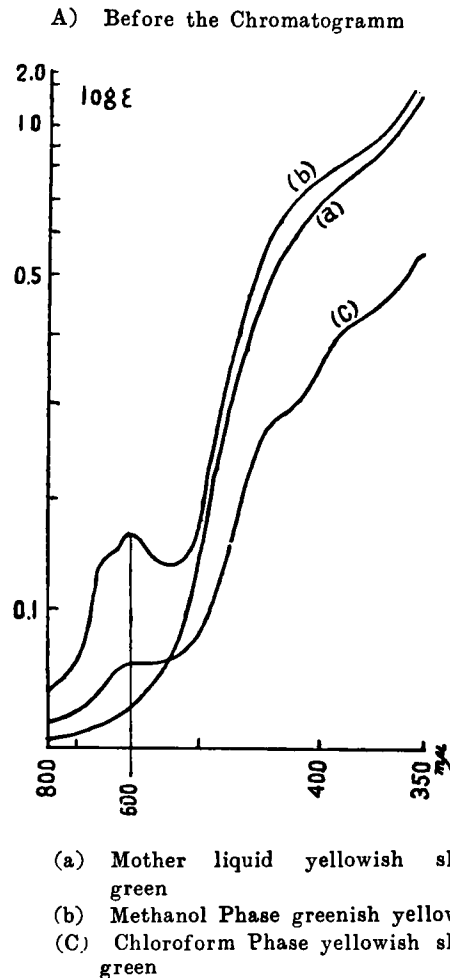


胆汁素定性反応はすべて陰性で、Chromatography 後は15日後のそれと等しい物質を得た。

なお定性反応中、Ehrlich 氏 Aldehyd 反応、Schlesinger 反応はいずれの場合も陰性であった。

以上の如く Bilirubin の Alkali 溶液中で空気中の酸素による酸化分解過程では Bilirubin は先づ Bilirubin 自体の変化に Chromatography 施行中加えた Alcohol の作用も加わり、その吸光曲線の極大を短波長側に移動しつつ減少するが、母液が Diazo 反応陰性となり吸収極大の認められなくなつた後も、なお Chromatography を行うことにより分離証明され、Methanol 層中で3日後まで、Chloroform 層中は5日後まで存在する。Methanol 中間層の Biliverdin は、その一部は Chloroform 抽出の際加えた塩酸により酸化されて出来たことは、反応直後でも微量の中間層が認められる点から明らかであるが、大部は空中の酸素による酸化のために生じ、その形成量は 650 mμ の吸光係数の高さを観察すると5日後が最高で以後次第に減少し、之も吸収極大を 640 mμ に移動している。Biliverdin は全経過を通じ Methanol 層に多く含まれ、Methanol 層中には

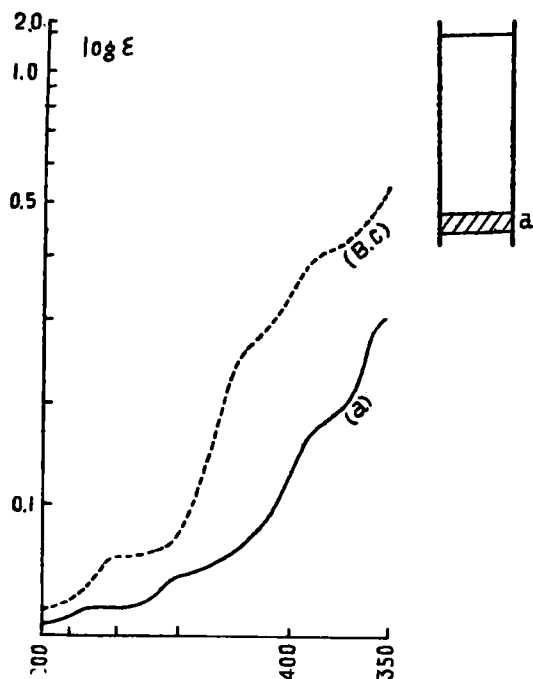
Fig. 13. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in a room for 20 days and those of separated zones of silica gel



全経過を通じ、Chloroform 層には10日まで存在するのは、Biliverdin が Methanol 可溶性、Chloroform 難溶性なることを示している。Pentdyopent 物質は反応5日後より母液中に現われ次第に増量し、Methanol 層中にも15日後より認められる²¹⁾。Chloroform 層に10日以後に現われる黄色物質は、Diazo 反応陰性で 500 mμ 附近より短波長側に向い上昇する曲線を有し、紫外吸収曲線で 280 mμ の吸収極大は不明であるが、すべての胆汁色素定性反応陰性で、醋酸性亜鉛末添加により褪色し、発煙硝酸滴下により無色となるから Bilifuscin と考えられる。

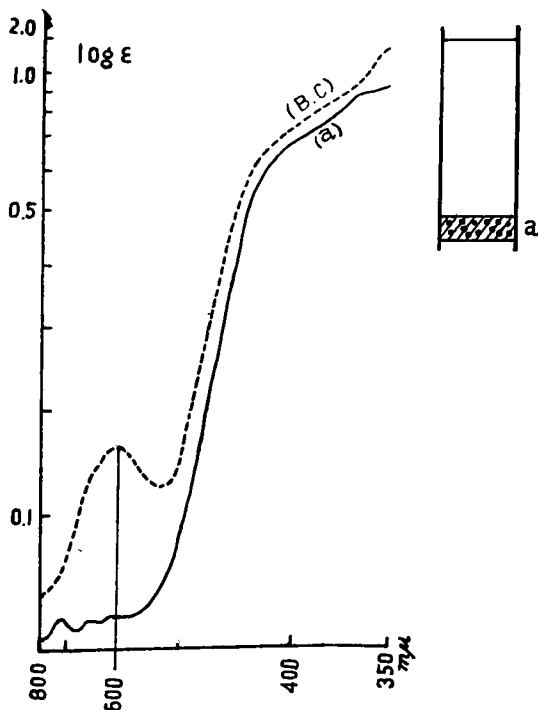
次に前回同様結晶 Bilirubin 約 2.4 mg を N/10 苛性曹達水溶液と N/10 磷酸塩緩衝液とで pH 9.2 とした溶液中に溶解したものを直射日光に曝して検

B) Methanol Phase



(B.C.) Before the Chromatogramm greenish yellow
After the Chromatogramm
(a) greenish yellow

C) Chloroform Phase



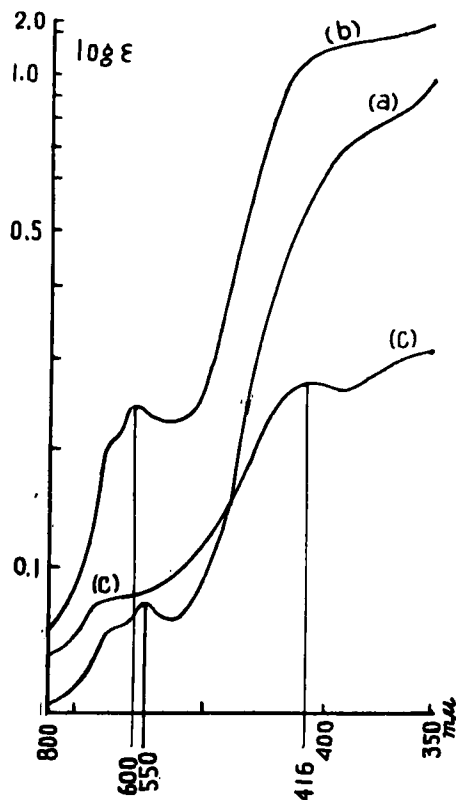
(B.C.) Before the Chromatogramm green,
after the Chromatogramm
(a) light yellow

討すると Fig. 14~18 のようになった。

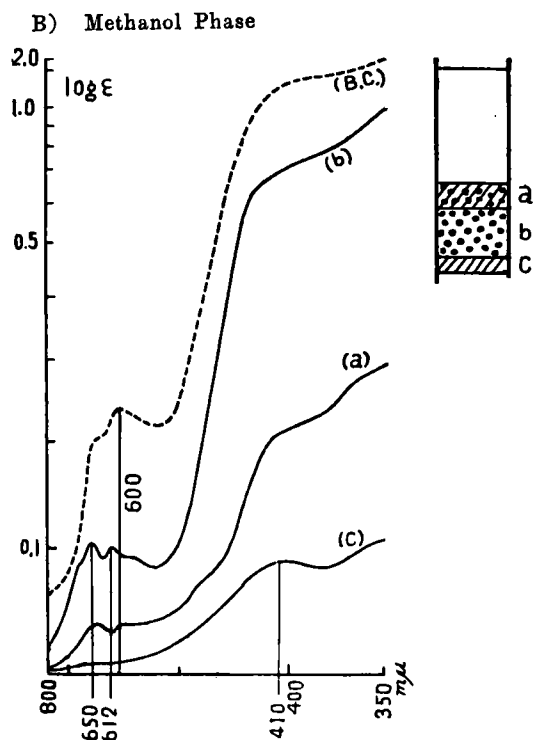
反応3日後は (Fig. 14) 母液は黄緑色で 650 mμ 附近の膨隆, 580 mμ の吸収極大と 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し, Diazo 反応陰性, Gmelin 反応疑陽性, Pentdyopent 反応陽性であつた。この際の Methanol 層は緑黄を示し, 650 mμ 附近の膨隆, 600 mμ の吸収極大と 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し Gmelin 反応のみ陽性で, Chromatography を行くと 410 mμ に極大を有し, Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の黄色 Bilirubin 層 (c) と, 650 mμ の極大を示し Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に, 612 mμ の極大と紫外部に向い上昇する曲線を有する物質を含む緑黄層 (b) と, 650 mμ の極大を示し Gmelin 反応のみ陽性の Biliverdin に 500 mμ 附近より紫外部に

Fig. 14. Absorption curves of N/10 sodium hydroxyde and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in the sunshine for 3 day and those of separated zones on silica gel

A) Before the Chromatogramm



(a) Mother liquid yellowish green
(b) Methanol phase greenish yellow
(c) Chloroform Phase light yellow



(B.C.) Before the Chromatogramm greenish yellow

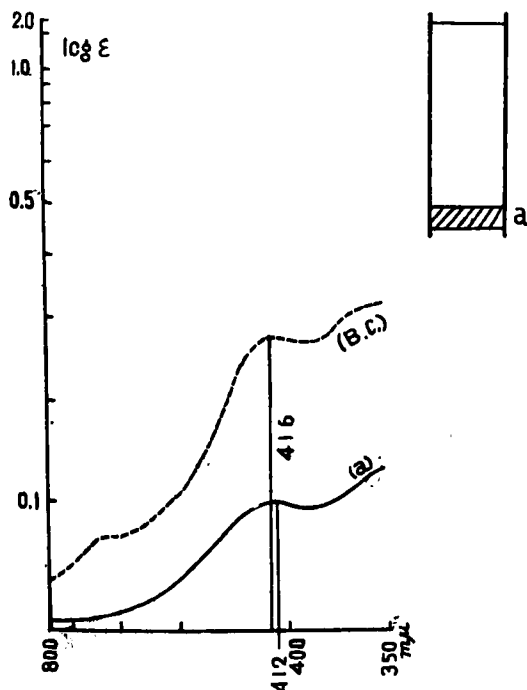
After the Chromatogramm

(a) light yellowish green

(b) green

(c) yellow

C) Chloroform Phase



(B.C.) Before the Chromatogramm light yellow

After the Chromatogramm

(a) light yellow

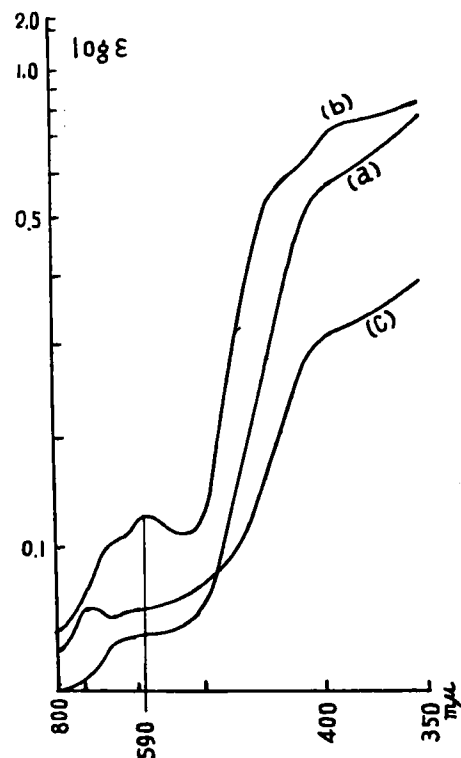
向い上昇する曲線を有する物質を含む淡黄緑層 (a) は得られたが, Pentdyopent 物質は証明されなかつた. Chloroform 層は淡黄色, 650 mμ 附近の膨隆と 416 mμ の吸収極大を示し, Diazo 反応, Gmelin 反応共陰性で, Chromatography を行うと淡黄色, 412 mμ に吸収極大を示し, Diazo 反応, Gmelin 反応共陽性の Bilirubin が得られたが, Biliverdin, Pentdyopent 物質は認められなかつた.

反応 5 日後は (Fig. 15) 母液は黄微緑, 650 mμ 附近の膨隆と 500 mμ 附近より紫外部へ向い上昇する曲線を示し, Pentdyopent 反応のみ陽性である.

Methanol 層は緑黄色で 650 mμ 附近の膨隆と 590 mμ の極大, 500 mμ 附近より紫外部に向い上昇する曲線を示し, Gmelin 反応, Pentdyopent 反応陽性である. Chromatography 後は黄緑色で 640 mμ の極大と紫外部へ向い上昇する曲線を有す

Fig. 15. Absorption curves of N/10 sodium hydroxyde and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in the sunshine for 5 days and those of separated zones on silica ge

A) Before the Chromatogramm

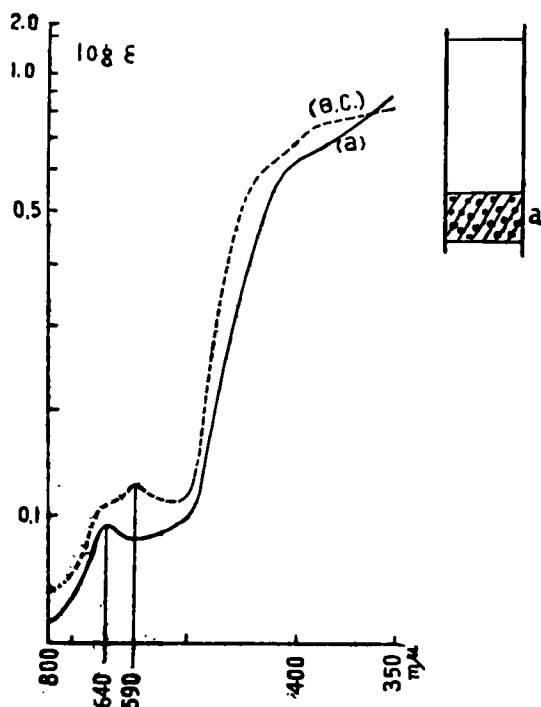


(a) Mother liquid yellowis slight green

(b) Methanol Phase greenish yellow

(c) Chlorofrom Phase light yellow

B) Methanol Phase

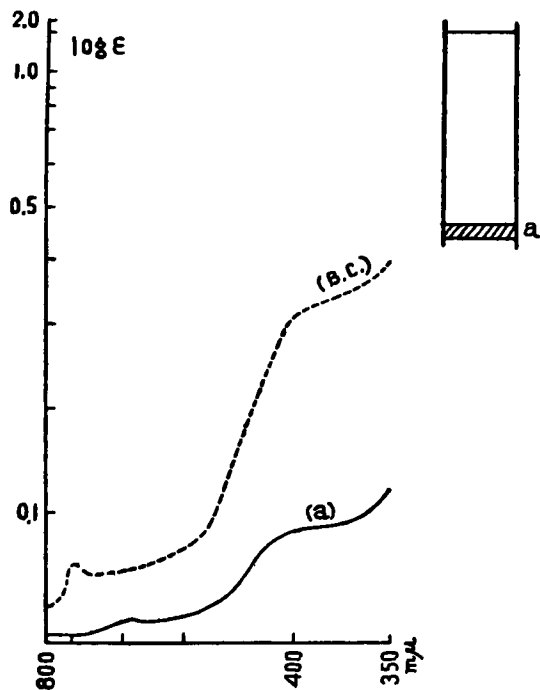


(B. O.) Before the Chromatogramm greenish yellow

After the Chromatogramm

(a) yellowish green

C) Chloroform Phase



(B. C.) Before the Chromatogramm light yellow

After the Chromatogramm

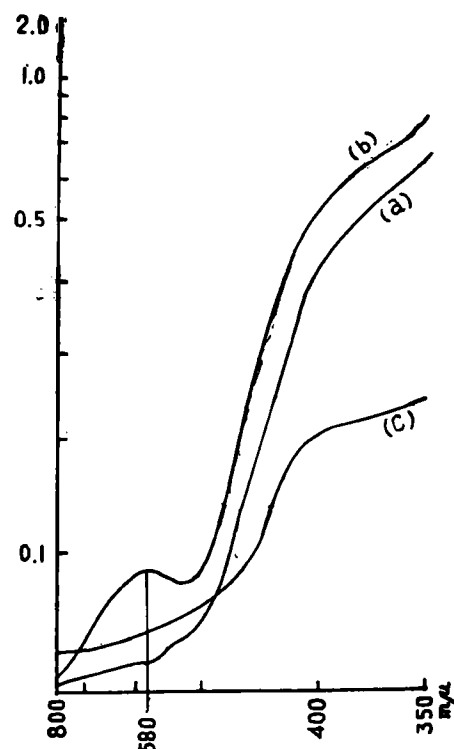
(a) light yellow

る物質を含み, Gmelin 反応, Pentdyopent 反応陽性で, Biliverdin と Pentdyopent 物質を含んでいるが Bilirubin や 590 mμ に極大を有する物質は証明されなかった。Chloroform 層は淡黄で, その吸光曲線は紫外部へ向い上昇するのみであり, 胆汁色素定性反応陰性で, Chromatography 後も淡黄で, 同じく短波長側に向い上昇する曲線を示し, 胆汁色素定性反応陰性, 発煙硝酸滴下により無色となり, 醋酸々性亜鉛末添加で褪色した。

10 日後は (Fig. 16) 母液は黄色, 吸光曲線は 500 mμ 附近より紫外部へ向い上昇を示し, Pentdyopent 反応のみ陽性である。Methanol 層は 580 mμ の極大と紫外部へ向い上昇を示し Gmelin 反応疑陽性, Chromatography 後は 640 mμ に小さい極大と紫外部に向い上昇する曲線を有し, Gmelin 反応疑陽性, Pentdyopent 反応陽性で Biliverdin の存在

Fig. 16. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting stading in the sunshine for 10 days and those of separated zones on silica gel

A) Before the Chromatogramm

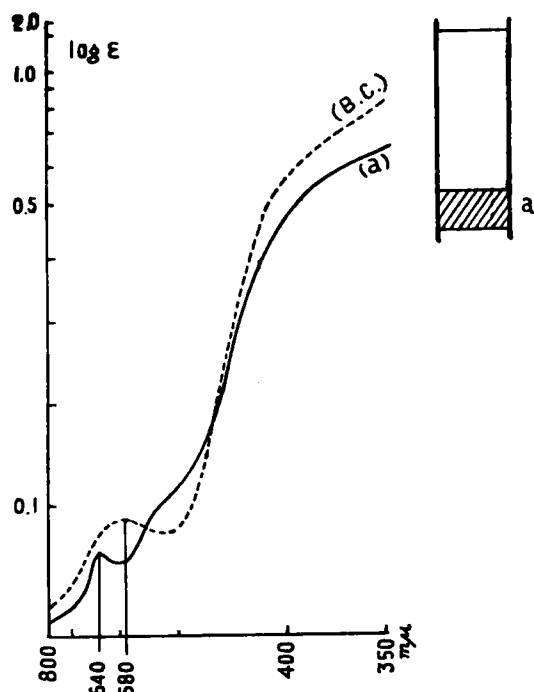


(a) Mother liquid yellow

(b) Methanol Phase yellowish green

(c) Chloroform Phase light yellow

B) Methanol Phase



(B. C.) Before the Chromatogramm yellowish green

After the Chromatogramm

(a) yellow

を疑わしめた。Chloroform 層は淡黄で短波長側に向い上昇する曲線を示し、すべての胆汁色素定性反応陰性、発煙硝酸滴下により無色となり、醋酸々性亜鉛末添加で褪色した。Chloroform 層は抽出量が少いため、Chromatography は行わなかつた。

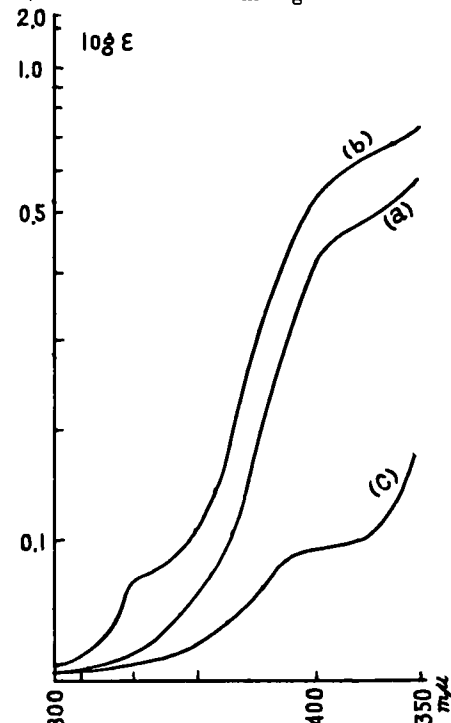
15日後は (Fig. 17) 母液は黄色で、吸光曲線、定性反応共10日後のそれと等しい。Methanol 層は黄色、Chromatography 後は淡黄色となつたが、いずれの場合も吸光曲線は短波長側に向い上昇するのみで、すべての胆汁色素定性反応陰性、発煙硝酸滴下で無色となり、醋酸々性亜鉛末添加で褪色したが、Biliverdin, Pentdyopent 物質は証明出来なかつた。Chloroform 層は微黄色を呈し、10日後のそれと同様であつた。

20日後は (Fig. 18) 母液は淡黄、吸光曲線、定性反応共10日後のそれと等しい。Methanol 層は黄色、Chromatography 後は淡黄褐色を呈し、吸光曲線、定性反応共15日後のそれと等しい。Chloroform 層には色素の抽出不能であつた。

以上 Bilirubin は3日まで存在し、Biliverdin は3日が最高で以後減少し、Methanol 層中には10日まで、Chloroform 層には3日まで存在、Pentdyo-

Fig. 17. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in the sunshine for 15 days and those of separated zones on silica gel

A) Before the Chromatogramm

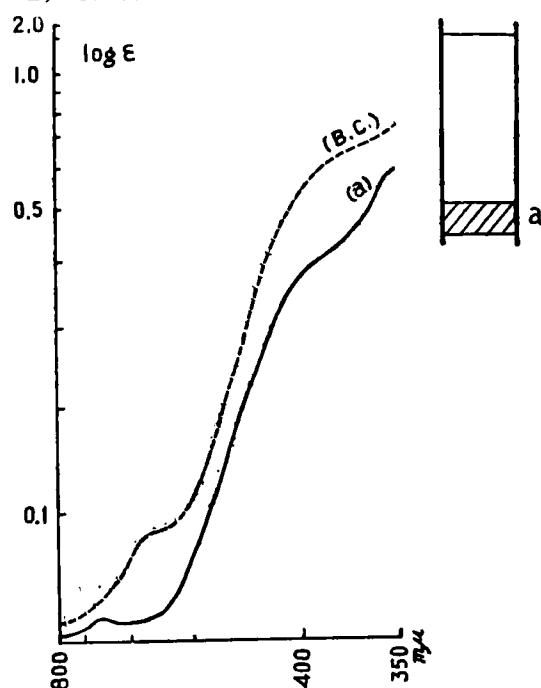


(a) Mother liquid yellow

(b) Methanol Phase yellow

(c) Chloroform Phase slight yellow

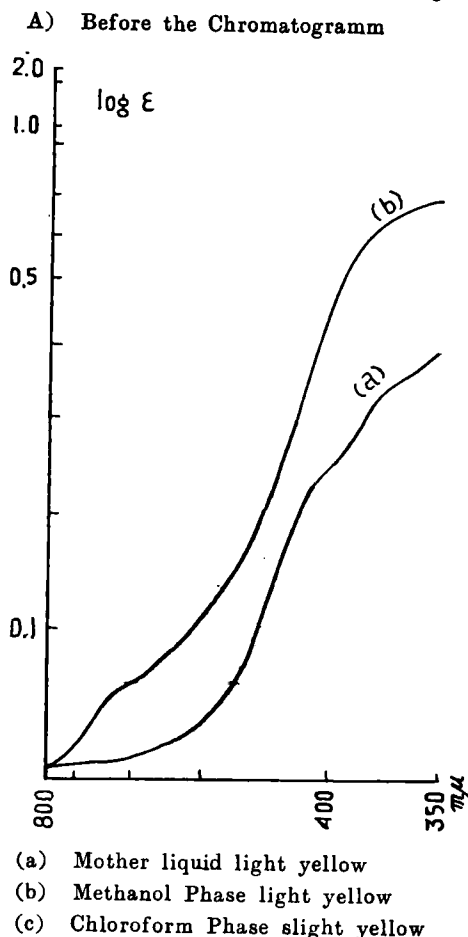
B) Methanol Phase



(B. C.) Before the Chromatogramm yellow
After the Chromatogramm

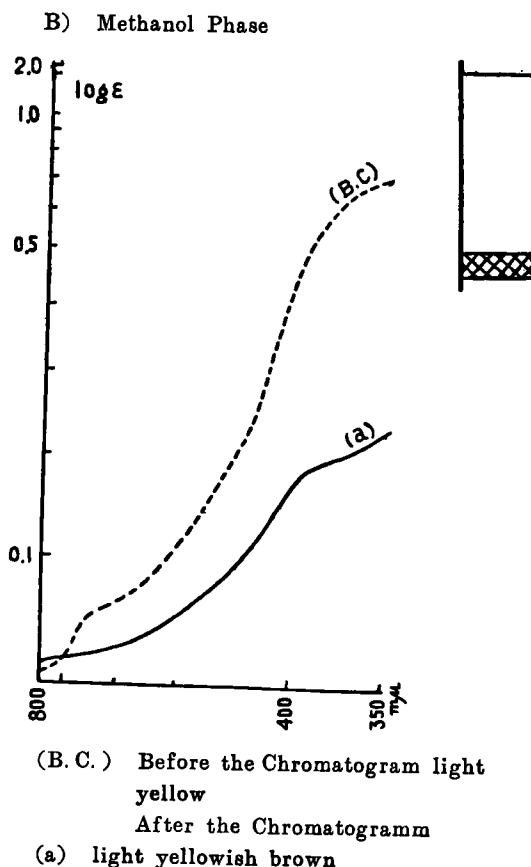
(a) light yellow

Fig. 18. Absorption curves of N/10 sodium hydroxide and N/10 phosphate buffer solutions after letting standing in the sunshine for 20 days and those of separated zones on silica gel



pent 物質は3日より現われ、その形成量は5日後が最高で以後減少し、5日、10日後には Methanol 層中にも証明出来た。Diazo 反応陰性の黄色物質は Chloroform 層に5日後、Methanol 中に15日後より現われる。即ち日光曝射時の経過は室温下放置のそれと等しいが、分解速度は室温下放置の約3倍早く進行し、之は小坂²³⁾の云う如く、日光紫外線的作用により Bilirubin の破壊が促進されたと考えられる。

又 Bilirubin 溶液の濃淡により分解経過時間に差のあることは、化学反応速度が、温度、溶媒の物理化学的性状の外、濃度に影響される点が大いことを考える時、容易に理解されるが、兎も角稀薄溶液中では Biliverdin 形成1時間後、Pentdyopent 形成6時間後、Bilifuscin 形成2日後より始まり、濃厚溶液では Biliverdin 3時間、Pentdyopent 5日、



Bilifuscin 10日後よりと、共に Bilirubin より Biliverdin, Pentdyopent 物質, Bilifuscin の順に変化して行くのが認められた。

以上 Lemberg, Barac の謂う如く Bilirubin は Alkali 溶液中で空気中の酸素に酸化され、先づ Biliverdin となる。次で中央β位の Methin 結合が切れ²⁴⁾、半切されて Propentdyopent 物質となり、之は強 Alkali 溶液中で Natrium hydrosulfit を加え還元することにより Natrium 塩となり、紅色の Pentdyopent 反応を呈することにより証明される。又無色の Propentdyopent 物質は黄乃至黄褐色の Bilifuscin に至る中間産物と云われているから、Propentdyopent 物質の出現後に現われる黄乃至黄褐色の物質は Bilifuscin なることがわかる。

Siedel によると Fischer の所謂 Körper II は数種の Dipyrromethen の混合物で、Bilifuscin と同一物であり、而して Bilirubin を酸化して生ずる無色の水溶性 Probilifuscin 溶液に塩酸を加えることにより出来る褐色の Bilifuscin は、重合の差により各種溶媒に対する溶解度が異なる異性体を有すると云う。著者の濃厚溶液中での実験では Bilifuscin は先づ母液中に3日後、Methanol 層中に5日後、

Chloroform 層中10日後より出現し、その完全分離される時期は Chloroform 可溶性 Bilifuscin 10日後、Methanol 可溶性 Bilifuscin は20日後より得られた。

実験の部

1) Bilirubin は Kodak 会社製結晶 Bilirubin を使用した。

2) Bilirubin の苛性曹達水溶液に各種 pH の磷酸塩緩衝液を加えた場合の酸素酸化速度の検討

結晶 Bilirubin 1.0 mg に N/10 NaOH 水溶液を 5.0 cc 加え完全溶解した後、その 1.0 cc 宛を 4 本の試験管に分注し、各々に各種 pH の磷酸塩緩衝液 9.0 cc を加え、各試験管の pH を 9.2, 8.2, 7.2, 6.2 とした。

この Bilirubin 溶液を室内比較的暗所に放置し、その間、溶解直後、1, 3, 6 時間、2, 3, 5, 10 日に汎り、Beckman DK 型自記分光々度計を用い可視部吸光曲線を製作し、同時に肉眼的に色調の観察及び Diazo 反応、Gmelin 反応、Ehrlich 氏 Aldehyd 反応、Schlesinger 反応、Pentdyopent 反応を行った。

3) Bilirubin の苛性曹達水溶液に磷酸塩緩衝液を加えた時の紫外部吸光曲線及び定性反応

結晶 Bilirubin 1.0 mg を Chloroform 10.0 cc に溶かし、その 4.0 cc を 60°C の重濃煎中で減圧乾固させる。この乾固物に N/10 NaOH 水溶液 1.0 cc を加えて溶解し、更に N/10 磷酸塩緩衝液 9.0 cc を加えて pH 9.2 とした。

この Bilirubin 水溶液を室内比較的暗所に放置

し、その内、溶解直後、3, 6 時間、2, 3, 5, 10, 20日に汎りその 1.0 cc を取出して pH 測定後、同一 pH の磷酸塩緩衝液 4.0 cc を加え、Beckman DK 型自記分光々度計を用い紫外部吸光曲線を描き、更に色調の肉眼的観察を行った。この後その 1.0 cc に発煙硝酸 2~3 滴を加え色調の変化を検し、又 2.0 cc に氷醋酸 0.2 cc と垂鉛末 1 刀尖を加え 2 時間観察した。2 時間後試験管底に沈んだ垂鉛末を除き上清を別の試験管に移し、又先の発煙硝酸を滴下した試験液と共に室温に 24 時間放置し、色調の変化を肉眼的に観察した。

4) Propentdyopent 物質及び Pentdyopent 反応
結晶 Bilirubin 2.0 mg を Chloroform 20 cc に溶かし、その 2.0 cc, 4.0 cc, 8.0 cc を 60°C の重濃煎中で減圧乾固させた後、実験 2), 3) と同様夫々に N/10 NaOH 水溶液 1.0 cc と N/10 磷酸塩緩衝液 9.0 cc を加え pH 9.2 とし、3 日間室温に放置した後岩原法により脱色を行った。即ち Bilirubin 水溶液 10 cc に 10% 醋酸鉛水溶液 6.0 cc を加え濾過した濾液に、飽和第二磷酸曹達水溶液 2.0 cc を加え濾過して得た殆んど無色透明な濾液中に含まれる Propentdyopent 物質を Beckman DK 型自記分光々度計で紫外部吸光曲線を求めた。

更にこの濾液 4 cc に 15% KOH 水溶液 2 cc と Na₂S₂O₄ 3 刀尖を加え、沸騰した重濃煎中に 2 分間浸した後取出し、その可視部吸光曲線を Beckman DK 型自記分光々度計で描き、得た吸収極大 523 m μ の吸光係数を QB 50 型 Beckman 分光々度計を用い測定した (Table 2)。

Table 1. Hourly change of extinctions coefficient of Pentdyopent substance.
(Crystalline bilirubin 0.4mg)

	3 hors	6 hors	2 days	3 days	5 days	10 days	20 days
Pentdyopent Substance (523m μ)	—	0.255	0.338	0.467	0.401	0.282	0.233

その結果結晶 Bilirubin 4.0 mg を Chloroform 40 cc に溶かした後 32 cc を取出し 60°C の重濃煎中で減圧乾固後、同様に N/10 NaOH 水溶液 8.0 cc と N/10 磷酸塩緩衝液 72 cc に溶かし、pH 9.2 としたものを実験 3) と同様に放置し、溶解直後、3, 6 時間、2, 3, 5, 10, 20 日後に 10 cc 宛取出し、上記の方法で脱色発色させた後、523 m μ の吸光係数の時間的变化を求めた。

5) Bilirubin の苛性曹達水溶液に磷酸塩緩衝

液を加えたものの酸素酸化過程途中の Column Chromatography

結晶 Bilirubin 14 mg を N/10 NaOH 水溶液 3.6 cc に溶解し、その 0.6 cc を 6 本の試験管に分注し、各試験管に N/10 磷酸塩緩衝液 5.4 cc を加え pH 9.2 とした後、室内の比較的暗所に放置し、3 時間、3, 5, 10, 15, 20 日の後 1 本宛の試験管を取出し、下の如く実験を行った。

先づその 1.0 cc に同一 pH の磷酸塩緩衝液 9.0 cc

を加えて母液にした。残りの 5.0 cc に N/10 HCl 7.5 cc を加えた後 Chloroform を加え充分振盪し、色素の Chloroform 抽出を行つた。この操作を数回 Chloroform が着色しなくなるまで繰返し行い、集めた Chloroform を Chloroform 層とした。又この際 Chloroform 層の上部に出来た緑色泡沫層を取出し集め、之を Methanol に溶かし、Methanol 中間層とした。そして更にこの二者を関東化学製 Silica-gel を吸着剤として Column Chromatography を行つた。展開液は Chloroform 層は、Chloroform : ethanol を 4 : 1 の混液で行つた。Methanol 中間層はこの混液で展開すると緑色物質の析出を見、分割流下しないので Chloroform : ethanol 2 : 1 の混液を用いた。分離層は自然滴下させて分割採受した。そして母液、Chloroform 層、Methanol 中間層及び夫々の分割層について色調の肉眼的観察、自記分光々度計による可視部吸光曲線の作製、Diazo 反応、Gmelin 反応、Ehrlich 氏 Aldehyd 反応、Schlesinger 反応、Pentdyopent 反応を行つた。又 Diazo 反応陰性の黄色層については、紫外部吸光曲線作製及び実験 3) の発煙硝酸滴下試験、醋酸々性亜鉛末添加試験を行つた。

6) Bilirubin の苛性曹達水溶液に磷酸塩緩衝液を加えたものの日光曝射時の酸化過程途中の Column Chromatography

・結晶 Bilirubin 12 mg を N/10 NaOH 水溶液 3.0 cc に溶解後 0.6 cc 宛 5 本の試験管に分注し、各試験管に N/10 磷酸塩緩衝液 5.4 cc を加えて pH 9.2 としたものを 10 月の直射日光に 3, 5, 10, 15, 20 日間連日 5 時間宛曝射させた後、実験 5) と同様

に分割検討した。

7) pH 測定は東洋濾紙 pH 試験紙で行つた。

結 論

1) Bilirubin の Alkali 溶液中での酸素酸化は pH の高いものほど早く起り、Diazo 反応は Bilirubin の吸光曲線の吸収極大が消失した後もしばらく陽性である。

2) Propentdyopent 物質の水溶液中吸収極大は 264 mμ, Pentdyopent 物質は 523 mμ, Bilifuscin は水溶液中で 270 mμ にその吸収極大を有する。

3) 酸化過程に於て Bilirubin は先づ Biliverdin となり、次で Pentdyopent 物質を経て Bilirubin となる。

4) Bilirubin は Alkali 溶液中でその吸収極大消失し、Diazo 反応陰性となつた後も Chromatography を行うことにより Bilirubin を証明出来、又同様に Biliverdin も分離証明出来る。

5) 日光曝射時は室内放置の場合と、その反応経過は等しいが、分解速度は遙かに早い。

6) Bilifuscin はその重合の差により、先づ水溶液が、次で Chloroform 可溶性、Methanol 可溶性のものが分離される。

文 献

- 1) L. Heilmeyer u. W. Krebs: Biochem. Zschr. **223**, 352, (1930)
- 2) A. Thsel u. O. Peter: Biochem. Zschr. **271**, 1, (1938)
- 3) 江国: 医学研究, **22**, 98, (1952)
- 4) R. Lemberg: Biochem. J. **28**, 979, (1934)
- 5) G. Barac: Compt. rend. soc. biol. **140**, 563, (1946)
- 6) 木村: 医学研究, **25**, 859, (1955)
- 7) L. Heilmeyer: Biochem. Z. **232**, 225, (1931)
- 8) 岩原 日内会誌, **40**, 117, (1951)
- 9) K. Bingold: Klin. Wschr. **14**, 1287, (1935)
- 10) R. Lemberg & J. W. Egge: Hematin compound and Bile pigments; Interscience Publishers. N. Y. (1949)
- 11) W. Siedel u. H. Möller: H. **259**, 113, (1939)
- 12) G. Meldolesi, W. Siedel u. H. Möller: H. **259**, 137, (1939)
- 13) 村上・有機化学の進歩, 9 集, 共立出版会社. 東京, (1954)
- 14) A. Gillan & E. S. Stren: Electronic Absorption & Spectroscopy, Edward Arnold Publisher, London, (1954)
- 15) W. Siedel, W. v. Pölnitz u. F. Eisenreich: Naturwiss. **34**, 314, (1947)
- 16) W. Siedel, W. Stich u. F. Eisenreich: Natu-

- rwiss. 35, 316, (1948)
- 17) 岩田 : 医学研究, 21, 828, (1951)
- 18) P. Müller u. L. Eenger : H. 200, 145, (1931)
- 19) 岩田 : 医学研究, 21, 841, (1951)
- 20) 天田 : J. Biochem. 32, 187, (1940)
- 21) 日伝 : 未発表.
- 22) H. Fischer u. H. F. v. Dobeneck : H. 263, 125, (1940)
- 23) 小坂 : 東京医事新誌, 67, No. 10, 19, (1950)
- 24) K. Bingold : Med. Klinik, 41, 475, (1946)

Spectrophotometric Studies on the Decomposition of Biliubin

Part I Studies on the Oxidation of Crystalline Bilirubin by Oxygen in Caustic Soda Solution

By

Ryo Takeuchi

The First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Chief : Prof. K. Kosaka : Director : Prof. K. Yamaoka, Kyushu University)

1. The oxidation of bilirubin by oxygen in alkaline solution was rapidly performed with high pH value, and the diazo reaction was positive for a while after the disappearance of the absorption maximum of bilirubin.
 2. The absorption maximum of pentdyopent product displayed at 264 m μ , that of pentdyopent product displayed at 523 m μ and that of bilifuscin displayed at 270 m μ in aqueous solution.
 3. Bilirubin turned into biliverdin at first, and then it turned into bilifuscin through pentdyopent product on the oxidation process.
 4. Bilirubin and biliverdin were identified by chromatography in alkaline solution of bilirubin after the disappearance of its absorption maximum and the display of negative diazo reaction.
 5. The oxidation process of bilirubin in the sun light was same to that in the air, but the decomposition velocity of the former was more rapid than that of the latter.
 6. Bilifuscin was separated, by the difference of cross-combination, in order of water soluble, chloroform soluble and methanol soluble one.
-